Aula 5

PREPARAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA OBSERVAÇÃO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA

META

Apresentar algumas normas de preparação de material biológico para observação no microscópio eletrônico.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
Compreender os aspectos principais sobre procedimentos utilizados para observação em microscopia eletrônica.

PRÉ-REQUISITO

O aluno deverá rever as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

Fabiana Silva Vieira

INTRODUÇÃO

Olá, caro aluno! Esperamos que você tenha aproveitado bastante o conteúdo apresentado nas outras aulas, uma vez que este é o nosso último encontro nesta disciplina. Nele vamos aprender a preparar o material para análise em microscópio eletrônico, seguindo de forma detalhada as etapas desse processo. Para isso, é fundamental que você tenha compreendido o conteúdo estudado na aula passada, em que abordamos as diferenças entre o microscópio ótico e o eletrônico e entre o MET (microscópio eletrônico de transmissão) e o MEV (microscópio eletrônico de varredura).

Caso você ainda tenha dúvidas, não hesite em procurar o tutor em seu pólo ou através da Internet. Não as deixe guardadas, sempre que possível, procure discuti-las não só com o tutor, mas também com seus colegas. Quem sabe elas sejam comuns a outros alunos. Pense bem nisso e vamos a nossa aula.

Microscópio Eletrônico de Varredura (Fonte: http://www.las.inpe.br).

PROCEDIMENTOS PARA OBSERVAÇÃO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Os procedimentos empregados para observação das estruturas biológicas no microscópio eletrônico implicam uma série de procedimentos técnicos que garantam um contraste, conservação do material mais próximo ao in vivo, resistência quando submetidas ao bombardeamento de elétrons e ao vácuo, além de manutenção da integridade bioquímica do material. No quadro a seguir, mencionamos os aspectos de rotina e normas comuns a muitos dos procedimentos empregados em microscopia eletrônica (Tabela 1).

MET	MEV
Fixação	Fixação
Desidratação	Desidratação
Inclusão	Secagem
Ultramicrotomia	Evaporação com ouro
Contrastação	

Tabela 1 - Quadro comparativo dos procedimentos para observação em microscopia eletrônica.

FIXAÇÃO

O objetivo da fixação é manter intacta a estrutura celular, impedindo, assim, que aconteçam a autólise, ou seja, destruição da célula pelas suas próprias enzimas, e a ação e proliferação de bactérias; garantir o enrijecimento das células para que resistam melhor às etapas posteriores à preparação do material; e aumentar a afinidade das estruturas celulares pelos corantes, melhorando o contraste. A fixação pode ser feita através do uso de agentes químicos ou por processos físicos.

A criofixação é um exemplo de agente físico e tem por fundamento submeter o material a ser analisado a um congelamento rápido. Esse congelamento pode ser feito a uma velocidade média de -1000º C por segundo, proporcionando a passagem da água do estado líquido para o sólido e formando cristais de gelo diminutos, ou com o emprego de hélio líquido (- 271º C).

A fixação mais empregada é a que utiliza agentes químicos. Normalmente, o espécime é imerso numa mistura de compostos químicos diversos e em proporções determinadas. A mistura deve considerar um pH e uma pressão osmótica adequados, ou seja, é feita em uma **solução tampão** que mantém o pH da solução final livre de alterações bruscas, condição necessária para uma boa fixação. Tecidos fixados em soluções não tamponadas passam por profundas alterações, pois a amostra sofre uma acidificação que modifica a estrutura das proteínas. Por meio do tamponamento

Ver glossário no final da Aula

de soluções fixadoras, a acidificação pode ser neutralizada ou, ao menos, retardada. O glutaraldeído, utilizado numa concentração de 2,5% tampão, seguido da refixação com tetróxido de ósmio a 1% são os fixadores mais empregados (Figura 1).

A)

B)

Figura 1 -(A) Recipiente contendo glutaraldeído e (B) tetróxido de ósmio.

DESIDRATAÇÃO

Após a fixação, o material deve ser bem lavado para, em seguida, ser desidratado. A desidratação consiste na retirada de água dos espécimes a serem analisados, evitando qualquer dano ao microscópio eletrônico, que funciona sob vácuo. Desse modo, toda a água é substituída gradativamente por concentrações crescentes de álcool etílico ou acetona até atingir 100% (Figura 2).

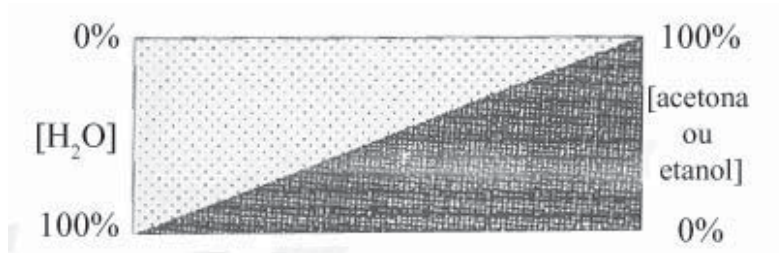



Figura 2 - Ilustração da dinâmica de substituição da água por etanol ou acetona. (Fonte: Benchimol et al, 1986).

INCLUSÃO

A inclusão é a próxima etapa para observar a preparação no MET. Todo o álcool ou acetona deve ser substituído por resina do tipo epóxi em estado líquido, com o objetivo de conferir ao material biológico a consistência adequada para ser cortado em fatias extremamente finas. Completada a infiltração da resina, o material é inserido em determinados moldes e submetido a uma temperatura média de 60º C por um período de dois dias. Este procedimento provoca o enrijecimento da resina e permite-nos obter bloquinhos que podem ser facilmente cortados em fatias muito finas (Figura 3).

Figura 3 - Moldes para resina.

Para haver formação de imagem no MET, é necessário que os elétrons possam atravessar o material biológico, que deve ser submetido a cortes muito finos. Os cortes são executados em aparelhos denominados ultramicrótomos, cuja navalha é de vidro ou de diamante.

ULTRAMICRÓTOMO

O conhecimento de ultra-estrutura celular somente avançou com o desenvolvimento de um aparelho denominado ultramicrótomo, que possibilitou cortes extremamente finos no material biológico com espessura de 1mm (Figura 4). A espessura desses cortes pode ser avaliada pela cor que mostram quando flutuam na superfície da água na cuba da navalha, resultado da interferência entre os raios luminosos refletidos na face superior e inferior do espécime. As cores cinza, prateada, dourada e vermelha correspondem, respectivamente, às seguintes espessuras em milímetros: 60, 60-90, 90-150, 150-190.

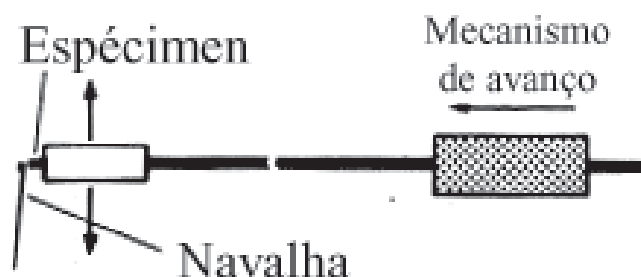



Figura 4. Arranjo básico de um ultramicrotómo. (Fonte: Grimstone, 1980)

A NAVALHA DESTE APARELHO PODE SER CONSTITUÍDA DE:

vidro: é frágil e por isso necessita ser freqüentemente substituída;. diamante: é resistente e de grande durabilidade, podendo ser utilizada por vários anos desde que não corte material que contenha inclusão muito dura.

PREPARAÇÃO DO BLOCO DE RESINA PARA VISUALIZAÇÃO NO MET

O bloco de resina pode ser de formato cilíndrico ou achatado. O suporte do ultramicrótomo é adaptado para cada caso. A extremidade do bloco que contém o espécime deve ser afeiçoada à mão como uma pirâmide (Figura 5).

Os cortes são colhidos em uma grade com diâmetro de 2 ou 3 mm, feita normalmente de cobre, mas que pode ser também de ouro quando houver tratamentos com reagentes que ataquem o cobre. A abertura da malha das grades é, freqüentemente, quadrada ou hexagonal e tem cerca de 0,1 mm (Figuras 5 e 6). Antes do uso, a grade é recoberta por um filme suporte fino, que forma o apoio definitivo para o espécime.

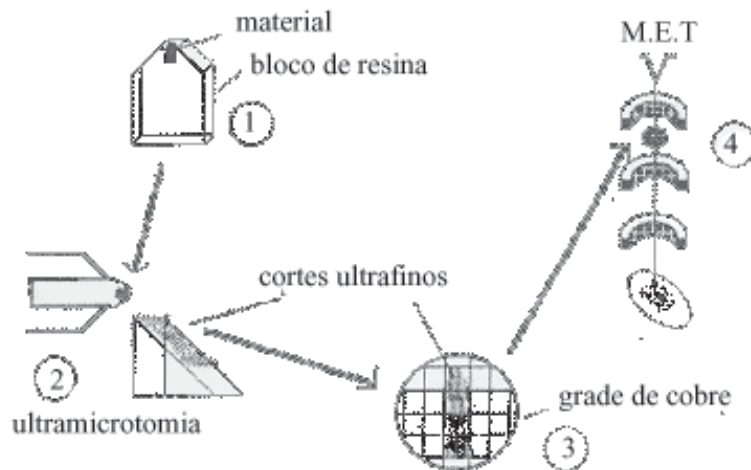



Figura 5. Etapas de processamento a partir do bloco de resina em que o material foi incluído até ser observado no microscópio eletrônico de transmissão. (Fonte: Benchimol et al, 1996).

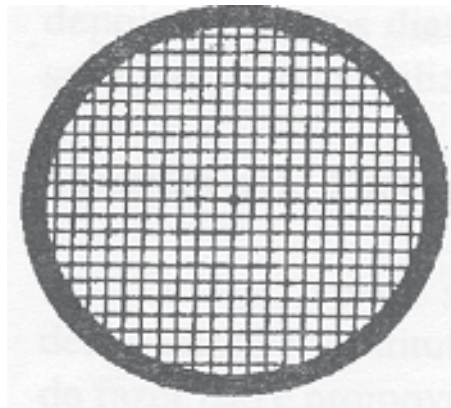



Figura 6. Grade para recolher os cortes vista em grande aumento. (Fonte: Benchimol et al, 1996).

CONTRASTAÇÃO

A contrastação corresponde à última etapa para o MET. As células e tecidos têm baixo poder intrínseco de espalhamento dos elétrons, de modo que se fossem levados diretamente para observação no microscópio eletrônico, veríamos poucos detalhes. Para garantir um bom contraste dos cortes, as amostras precisam ser tratadas com soluções de sais que contenham metais pesados em sua composição. Quanto maior o número atômico, melhor será o contraste. O acetato de uranila e o citrato de chumbo são exemplos de corantes bastante utilizados no MET. As grades contendo o espécime são imersas e deixadas nestas soluções por alguns minutos, antes de serem levadas para observação no microscópio.

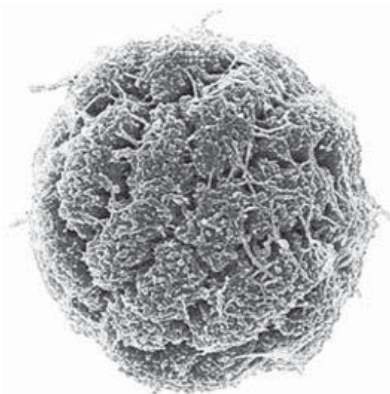
Vamos entender melhor como a imagem é formada para podermos compreender a importância de soluções com metais pesados na contrastação da amostra. A imagem no microscópio eletrônico é formada a partir

de feixes de elétrons emitidos do canhão eletrônico. Alguns elétrons do feixe, ao atravessarem a amostra, encontrarão átomos e serão desviados ou espalhados. Outros passarão diretamente pelo espécime e chegarão à tela fosforescente ou placa fotográfica.

A quantidade de elétrons espalhados por uma certa região da amostra depende do número de átomos por unidade de volume e da dimensão desses, já que o tamanho do átomo pode ser expresso em termos de número atômico. Quanto mais átomos existirem numa dada região e quanto maior a sua dimenção, maior será a probabilidade de colidirem com um elétron emitido através do canhão. As imagens no microscópio eletrônico são monocromáticas, isto é, em tons de cinza. As áreas escuras, cuja visualização é mais difícil, correspondem à região da amostra que espalha grande número de elétrons, enquanto as áreas mais claras são as regiões menos densas, que permitem a passagem livre de elétrons. Portanto, quanto maior o número atômico de um dado elemento, mais eficiente será no espalhamento dos elétrons.

SECAGEM

No MEV, o material é preparado para permitir a visualização da morfologia, o que seria impossível se ele estivesse coberto por resina. Então, nesse microscópio, a desidratação é seguida pela secagem, que pode ser efetuada de várias maneiras, sendo mais comum a que consiste na remoção do álcool ou acetona por ar, sem a deformação da célula. Todo o líquido é substituído por dióxido de carbono (CO2) liquefeito em uma câmara especial denominada câmara do aparelho em ponto crítico, em que o CO2 atinge o chamado **ponto crítico**.

A fim de que a amostra esteja pronta para observação no MEV, ela precisa ser banhada por um bom condutor de elétrons, normalmente é o ouro, que permita ao feixe de elétron varrê - la. Nos microscópios mais modernos não é mais necessário desidratar e nem banhar a amostra com metal.

Células da bactéria Araruama, ao microscópio eletrônico de varredura (Fonte: http://www.revistapesquisa.fapesp.br).

CONCLUSÃO

Os espécimes são, normalmente, frágeis, hidratados, facilmente danificáveis e apresentam pouco contraste natural. Por isso, é necessário, antes da observação no microscópio eletrônico, empregar métodos apropriados visando garantir sua integridade e melhor visualização. Existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para observação de material biológico em microscopia eletrônica. Nesta aula, citamos os aspectos básicos e, portanto, mais comumente empregados.

RESUMO

A preparação do material para observação no microscópio eletrônico é importante para garantir não só a integridade do equipamento, mas também a preservação do material. O procedimento clássico para o MET consiste na fixação do material com glutaraldeído e tetróxido de ósmio, que garante a integridade da estrutura a ser observada; desidratação por álcool etílico ou acetona; inclusão, que é o enrijecimento da estrutura através da infiltração de resina, facilitando o manuseio no aparelho conhecido como ultramicrótomo, que permite fazer cortes extremamente finos para facilitar a passagem do feixe de elétrons através do material. O material cortado é colocado em grades e deve ser contrastado através de substâncias contendo metais pesados, como o acetato de uranila e o citrato de chumbo, pois apresentam grande poder para dispersar elétrons, melhorando o contraste e, portanto, a visualização final. Para o MEV, repetem-se a fixação e a desidratação e acrescentam-se a secagem e a evaporação com ouro. Em microscópios mais modernos, as duas últimas etapas citadas anteriormente são dispensáveis.

ATIVIDADES

1. Explique as principais etapas de processamento das amostras que serão observadas no microscópio eletrônico.
2. Quais as principais diferenças do processamento da amostra para visualização no MET e no MEV? Explique o porquê disto.
3. Por que é necessário desidratar o material que será levado para observação no microscópio eletrônico?

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Se você respondeu a esta questão, então conseguiu compreender o assunto exposto nesta aula.
2. Para responder a esta atividade, você tem de entender qual o objetivo de se trabalhar com cada um desses microscópios, sua utilidade e quais estruturas podem ser observadas através deles.
3. Ao responder a esta questão, você demonstra que entendeu as implicações da não desidratação da amostra para o funcionamento do microscópio e para a formação da imagem.

REFERÊNCIAS

BENCHIMOL, Marlene et al. **Métodos de estudo de célula.** Editoração Eletrônica, Fenorte/UENF, 1996.

COOPER, Geoffrey M. **A célula**: uma abordagem molecular. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2005.

DE ROBERTIS, Eduardo; HIB, José; PONZIO, Roberto. **Biologia celular e molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GRIMSTONE, Albert Victor. **O microscópio eletrônico em biologia.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1980.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; Carneiro, José. **Biologia celular e molecular.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

LEAL, Luiz Henrique Monteiro. **Fundamentos de microscopia.** Rio de Janeiro: UERJ, 2000.

MACHADO, Raul Dodsworth; SOUTO-PADRÓN, Thais. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica:** técnicas básicas. v. 1. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1989.

VALLE, Francisco das Chagas. **Práticas de citologia e genética.** Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.